



TITLE:

自由:6 霊長類のカルシウム結合蛋白質の研究(Ⅱ 共同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

田之倉, 優

CITATION:

田之倉, 優. 自由:6 霊長類のカルシウム結合蛋白質の研究(Ⅱ 共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報 1993, 23: 77-78

ISSUE DATE:

1993-09-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/164447>

RIGHT:

種類。多いのがブタオザルの23種類であった。

これら7頭のマカクのオスについては、体重、犬歯の長さ、睾丸の大きさについても測定した。睾丸サイズは各種で大差はなかったが、体重あたりで言えばカニクイザルがいちばん大きい。また、犬歯はボンネットザルがもっとも発達していた。

各種サルの精巣の良好な標本があまり手に入らなかったため、造精機能についての統計的な処理はできなかった。また、行動観察についてもケージ内におけるペアリング実験であるため、これらの結果から一般的な結論を導くのは困難である。しかし、カニクイザルは多量の精子をつくる方向に進化し、一方でニホンザルは他のマカクと比べて造精機能が低いことを示唆する結果であると考えている。

自由：5

霊長類の比較遺伝子マッピングに関する研究

平井百樹（東京大・理）

蛍光 in situ hybridization (FISH) 法による霊長類の比較マッピングを行ない、従来のバンドパターン比較から構築された霊長類の核型進化の仮説を検証することを目的とした。現在、ゲノム・プロジェクトの一環として、ヒト第6番染色体上のクローン化された遺伝子・DNAフラグメントを用いたヒトのゲノムマッピングを行なっている。このクローンの一部を用いて、カニクイザル、マントヒヒ、アフリカミドリザル、チンパンジー等の染色体上へのクローンの位置付けを行ない、DNAレベルでの染色体比較を行なった。既に特定染色体特異的DNAレイブラリーをプローブとした染色体ペインティング法により、ヒト第6番染色体はチンパンジー、マカク、ヒヒ各種の1本の染色体、アフリカミドリザルの2本の染色体に対応することを明らかにしている。そこでヒト第6番染色体の代表的なバンド上のクローンをプローブとしてFISHを行なったところ、複雑な逆位の存在を示唆する結果を得た。すなわち一つの大きな連鎖群としての染色体は霊長類進化上保存的といえるが、染色体内部での遺伝子、DNAフラグメントの配列順序はかなり変化していることが考えられる。

このようなFISHによる染色体マッピングに基づく核型進化の研究には、なるべく多数のブロー

グを用いることが望まれるが、それには多大な労力と時間を必要とする。最近では、各種哺乳動物における比較マッピングをおこなううえで、ヒト染色体との対応に適したマーカーとなる基準遺伝子が各染色体について取り決められている。今後は、霊長類における比較マッピングもこの方向に沿って効率よく進める必要があると考える。

自由：6

霊長類のカルシウム結合蛋白質の研究

田之倉優（東京大・理）

カルシウム結合蛋白質は、生体内の種々の組織に広く分布し、各種の生体内反応の制御に重要な役割を果たしている。その中でバルブアルブミンは、魚類や両生類の白筋に大量に含まれるが、最近では哺乳類の骨格筋や神経細胞、分泌腺にも存在することが分かってきた低分子量のカルシウム結合蛋白質である。バルブアルブミンは、筋収縮においては弛緩因子として、また神経細胞においては活動電位発生後の再分極を速める因子として機能することが示唆されている。霊長類については、既にニホンザルの骨格筋から精製され、その性質が調べられている (Asaoka, K. and Tanokura, M. (1990) Comp. Biochem. Physiol. 96B, 665-669)。それによると、ニホンザルの骨格筋には分子量11,400 (SDS電気泳動)、等電点5.1の isoform がただ1種類存在し、筋肉1kgから3.9mgが抽出精製される。ニホンザルバルブアルブミンは、紫外吸収スペクトルとアミノ酸分析の結果とから、芳香族アミノ酸の Trp および Tyr を含まず、Asx、Glx、Phe、Lys を多く含むという EF ハンド型カルシウム結合蛋白質の特徴を持つことが示され、タンパク質1モルあたり、2モルのカルシウムを結合した。本研究では引き続き、ニホンザルにおいて組織特異的にバルブアルブミンの isoform が発現しているかどうか調べるために、小脳からバルブアルブミンを抽出精製した。バルブアルブミンの抽出は骨格筋と同様に TCA 法で行った後、続いて硫酸分画を行い70%飽和で沈殿する画分を除いて、精製度を上げた粗バルブアルブミンを得た。粗タンパク質は、HPLC ゲルろ過ならびに FPLC 陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。得られた小脳バルブアルブミンの分子量をエレクトロ

ニクスプレー質量分析法により決定したところ 11,938で、骨格筋バルブアルブミンと同じだった。これから、ラットなどの場合とは異なり、ニホンザルにおいては骨格筋と神経細胞の間でバルブアルブミンは同一の isoform が発現していると考えられる。

自由：7

ヒト神経芽細胞腫の抗原はサルの神経系に存在するか？

石田貴文（東京大・理）

神経芽細胞腫は神経外胚葉に由来する悪性腫瘍である。本研究では、日本で分離・樹立された NB-1 株を抗体作製の材料として用いた。NB-1 細胞は、通常の培養環境では培養器に弱い接着性を示す球形の細胞で、サイクリック AMP (dbcAMP) 存在下で増殖が抑制され神経細胞様に変化する。昨年度、NB-1 細胞を抗原としてモノクローナル抗体の作製を試み幾つかの抗体を得た。本年度はその抗体の性質を調べた。

300のハイブリドーマのうち4株（#6、#11、#15、#16）が使用に耐えた。それらのサブクラスが IgG 1 と IgM であることは昨年報告した。68Kd の抗原を認識するものと 59Kd の抗原を認識するものがあつた。次に、NB-1 細胞、cAMP 処理 NB-1 細胞、他の神経芽細胞腫（NB-39-nu 福島県立医大鈴木教授より恵与）、cAMP 処理 NB-39-nu、YT-nu）血球系細胞（Raji と BJAB）、ヒト新生児線維芽細胞（HNB 90-1）、肺腺癌細胞（PC3）を抗原として、得られた抗体の特異性を調べた。#6 は NB-1、NB-39-nu 由来細胞のみに、#11 は神経芽細胞腫と肺癌細胞に反応した。#15 は cAMP 処理した NB-1 細胞において線維状の構造、特に、神経様突起、及び、成長円錐を強く染色した。未処理のものでは極まれに細胞質が染まるが、その染色性は一樣では無く局在を示した。染色パターン、分子量から本抗体の認識する抗原はニューロフィラメントでは無いと考えられた。これらの抗原がニホンザルの脳にも存在するか調べるため、前頭前野、下側頭回、視覚野、海馬より試料を調整し SDS-PAGE-ウェスタンブロット法で反応性を調べたが、予想される箇所にバンドが見当たらなかったため、試料の調整と条件設定を再度確かめている。

自由：8

ニホンザルにおけるクー・コールの“会話”分析

杉浦秀樹（東京大・理）

ニホンザルはクー・コールを発して群れのメンバーどうして鳴き交わしをしていることが知られている。これまでの研究から群れのメンバーが発した音声に対する応答としてクー・コールが発せられた場合、その音声の音響的特徴は先行する音声の特徴と似ていることが明らかになった。これはニホンザルが応答する際に、他個体の発した音声の特徴に合わせて自分の発する音声の特徴を変化させている可能性を示唆している。

本年度はこのことを検証するためにプレイバック実験を行った。屋久島S群の大人メス5個を対象個体を選び、それぞれの対象個体ごとに基本周波数の高さの異なる3種類のクー・コールを再生し、その再生音に対して対象個体が応答したときの音声を録音した。実験はターゲット個体から約15mの位置にスピーカーを設置し、刺激音以外の音声の影響を避けるために少なくとも再生前5秒間はどの個体も発声していないことを確認したうえで1つのクー・コールを再生した。再生後10秒間録音を行いターゲット個体の音声を記録した。録音した音声はソナグラフを用いて、刺激音が終わってから次のクー・コールの始まるまでのインターバルを測定し、続いてその音響的特徴を調べるために基本周波数について発生の開始した点と終了した点、周波数の最大値及び最小値を与える点について時間及び周波数に関するパラメーターを測定した。

対象個体の発声は刺激音が再生されてから約1秒までの間に集中して起こっており、この間に起こった音声を応答とみなして分析した。1秒以内に発せられた音声について刺激音の基本周波数の高さと同対象個体の個体差を要因として二元配置分散分析を行なった。高い周波数の低い刺激音に対しては低い音声で応答する傾向が見られた。

この結果は、ニホンザルは聞こえてきた音声に合わせて応答する際の自分の音声の音響的特徴を変化させることができるという上述の仮説を支持するものである。

自由：9